Chulalongkorn Medical Journal

Volume 23
Issue 5 *January 1979*

Article 9

1-1-1979

วิธีการที่รวดเร็วในการตรวจหาเชื้อบัคเตรี 3 ชนิด ที่เป็นเหตุของโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ

ไหม รัตนวรารักษ์

พ่องพรรณ นันทาภิสุทธิ์

ดิลก เย็นขุตร

Follow this and additional works at: https://digital.car.chula.ac.th/clmjournal

Part of the Medicine and Health Sciences Commons

Recommended Citation

รัตนวรารักษ์, ไหม; นันทาภิสุทธิ์, พ่องพรรณ; and เย็นขุตร, ดิลก (1979) "วิธีการที่รวดเร็วในการตรวจหาเชื้อบัคเตรี 3 ชนิด ที่เป็นเหตุของโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ," *Chulalongkorn Medical Journal*: Vol. 23: Iss. 5, Article 9.
DOI: 10.58837/CHULA.CMJ.23.5.8
Available at: https://digital.car.chula.ac.th/clmjournal/vol23/iss5/9

This Other is brought to you for free and open access by the Chulalongkorn Journal Online (CUJO) at Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in Chulalongkorn Medical Journal by an authorized editor of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

วิธีการที่รวดเร็วในการตรวจหาเชื้อบัคเตรี 3 ชนิด ที่เป็นสาเหตุของโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ*

ไหม รัตนวรารักษ์**
ผ่องพรรณ นันทาภิสุทธิ์**
ดิลก เย็นบุตร**

การศึกษาวิธีการที่รวดเร็ว 2 วิธี ในการตรวจหาเชื้อ H. influenza, S. pneumoniae และ N. meningitidis ในน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยที่เป็นหรือสงสัยว่าเป็นโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบด้วยวิธี Counterimmunoelectrophoresis (CIE) ซึ่งใช้เวลาไม่เกิน 90 นาทีและ Latex agglutination (LA) 8 นาทีในแต่ละการทดสอบ จากตัวอย่างน้ำไขสันหลังของผู้ป่วย 115 ราย CIE ให้ผลบวกตรงกับผลการเพาะเชื้อ 7 ราย ผลลบตรงกัน 94 ราย ให้ผลแย้งกัน 14 ราย แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ที่ไปด้วยกันได้ระหว่างการเพาะเชื้อและ CIE นอกจากนี้ผลของ CIE มีความแน่นอนเฉพาะและความไวของปฏิกริยาขึ้นกับปริมาณและความสามารถของแอนติบอดี

LA 207 ตัวอย่างให้ผลบวก 23 ราย ลบ 175 ราย คลาดเคลื่อนผิดชนิดไป 9 ราย จากความไวของปฏิกริยา LA มีมากกว่าแต่ความแน่นอนน้อยกว่า CIE

น้ำเหลืองที่ใช้ในการศึกษาบางส่วน ได้จากกระต่ายซึ่งฉีดเชื้อบัคเตรีแต่ละชนิดในแต่ละกลุ่มคือ S. pneumoniae type 1,9,19 และ N. meningitidis group A antibody titer ที่ได้ไม่น้อยกว่า 1 : 8 ผลการทดสอบใน CIE เป็นที่น่าพอใจ

ในสถานการณ์ปัจจุบัน การหาชนิดของบัคเตรีที่มีอยู่ในน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยที่เป็นหรือสงสัยว่าเป็นโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ ที่เข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ทำได้ด้วยการเพาะเลี้ยงเชื้อซึ่งใช้เวลามากกว่า 1 วัน และมักเพาะเชื้อไม่ขึ้น ฉะนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องใช้

*ได้รับทุนวิจัยไซน่า เมดิคัล บอร์ด ประจำปี 2520
**แผนกจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 สรุปผลของ CIE และ LA เทียบกับผลการเพาะเชื้อจากรายงานต่างประเทศ

เชื้อที่ทดลอง	จำนวนตัวอย่าง (ราย)	จำนวนที่เชื้อเพาะขึ้น (ร้อยละ)	จำนวนที่ให้ผลบวก (ร้อยละ)		เอกสารอ้างอิง
			CIE	LA	
H. influenze	64	–	57(89.1)	–	6
	18	14	15(84.4)	–	11
	16	–	(88)	(94)	12
S. pneumoniae	14	–	11(78.5)	–	6
	4	4	2	–	11
	87	(98)	–	(82)	12
N. meningitidis	6	6	4(66.71)	–	6
	3	3	1	–	11
	126	–	(89)	(88)	12
	68	42 (62)	47(69)		5

– หมายถึงไม่ได้ทำหรือไม่ได้รายงานให้ทราบ

วิธีการที่รวดเร็วและน่าเชื่อถือมาเสริมการวินิจฉัย วิธีที่นิยมกันมากและให้ผลดีจากรายงานต่างประเทศ (ตารางที่ 1) ได้แก่ counterimmunoelectrophoresis (CIE) และ latex agglutination (LA) วิธีการแรกอาศัยแรงเคลื่อนไฟฟ้าช่วยให้แอนติเจนและแอนติบอดีเคลื่อนเข้ามาพบกันเร็วขึ้นภายใน 45–90 นาที[1-5] วิธีการหลังอาศัยอนุภาคเนื้อยคือ latex ช่วยโดยแอนติบอดีถูกทำให้เกาะอยู่รอบอนุภาค latex เมื่อแอนติบอดีจับกับแอนติเจนการเกาะกลุ่มและตกตะกอนจะเกิดเร็วภายใน 3–8 นาที[6,8,9,10]

คณะผู้วิจัยมีความประสงค์ที่จะนำวิธีการอันหนึ่งอันใด หรือทั้งสองมาใช้เพื่อช่วยในการวินิจฉัยหาเชื้อ 3 ชนิด ที่พบบ่อยคือ H. influenza, S. pneumoniae และ N. meningitidis ในน้ำไขสันหลังให้เร็วขึ้น ภายหลังจากเรียนรู้เทคนิคตัวแปรและสามารถแก้ไขอุปสรรคต่าง ๆ แล้วก็จะนำไปใช้สำหรับหาเชื้อบัคเตรีตัวอื่นๆที่เป็นสาเหตุด้วย และเนื่องจากแอนติซีรั่มบางชนิดราคาแพงมากจึงได้เตรียมขึ้นเองเพื่อประหยัดและเพิ่มปริมาณแอนติบอดี

วัสดุและวิธีการ

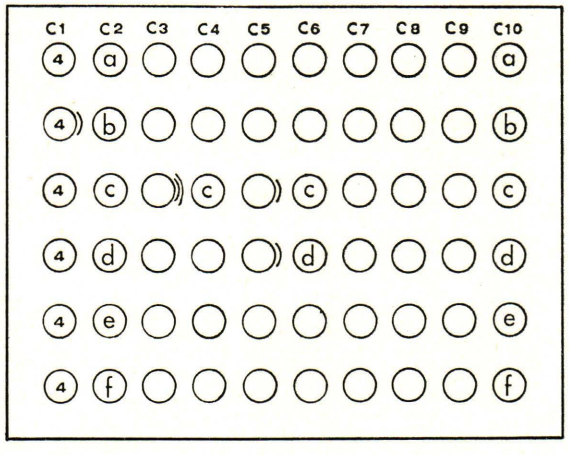
น้ำไขสันหลังมีลักษณะใส ไม่มีเลือดปน นำมาปั่น 2500 รอบต่อนาทีทันทีที่ได้รับหรือภายหลังจากการเพาะเชื้อ ที่ทำไม่ทันเก็บไว้ที่ –20°C น้ำไขสันหลังกลุ่มควบคุมบวก (control positive CSF) ได้มาจากตัวอย่างที่เพาะเชื้อขึ้น น้ำไขสันหลังกลุ่มควบคุมลบ (control negative CSF) ได้จากตัวอย่างที่ได้จากผู้ป่วยด้วยโรคอื่น หรือที่ให้ผลลบกับวิธีการ CIE หรือ LA

บัคเตรี : เชื้อ pneumococcus ที่รู้ชนิด 7 ชนิด คือ 1,9,14,16,18,19 และ 46 ได้จากคุณฉัตรชัย ศรชัย คณะวิทยาศาสตร์ มหิดล ซึ่งหาชนิดด้วย

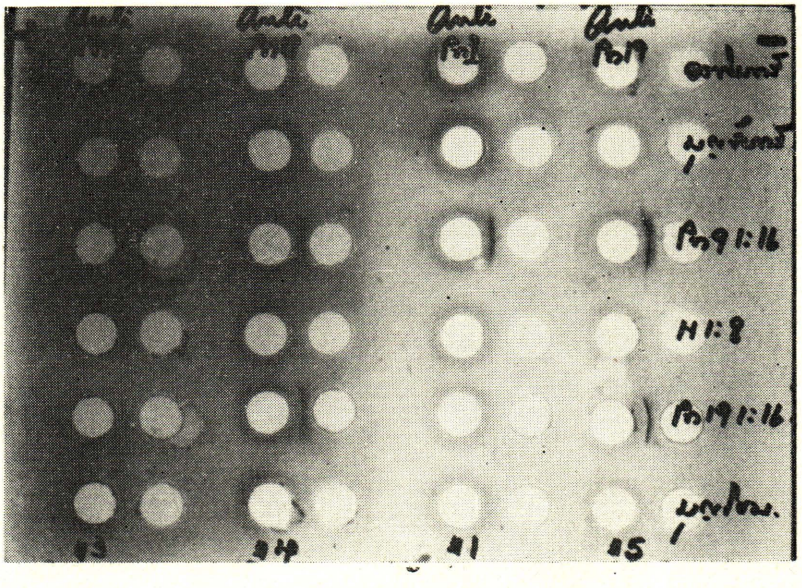
ภาพที่ 1 ปฏิกริยาเฉพาะของน้ำเหลืองต่อเชื้อนิวโมเนียชนิดต่าง ๆ

C1 = anti PnI 1:4
C3 = anti Pn9 1:4
C5 = anti Pn 19 1:4
C7 = anti Klebsiella (Und.)
C9 = anti E. coli (Und.)

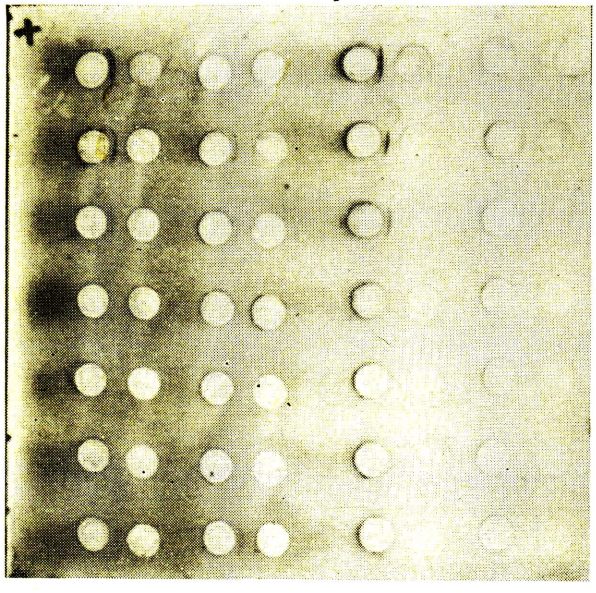
a = เพาะได้เชื้อ Salmonella
b = Pn I 1:8
c = Pn 9 1:8
c = Pn 19 1:8
e = Klebsiella
f = E. coli 1:8

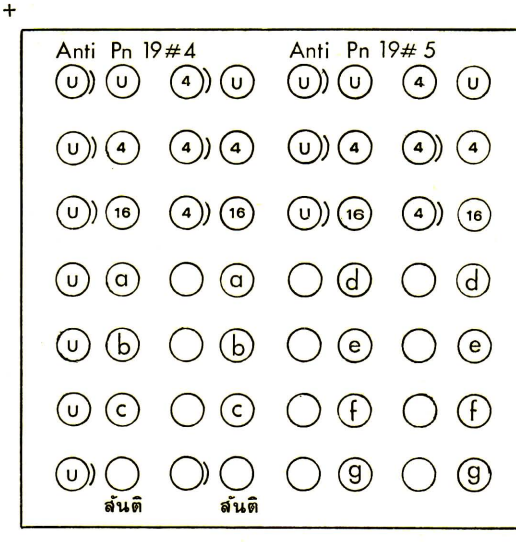


ภาพที่ 2 ปฏิกริยาข้ามกลุ่มของ Pn 9 antigen กับ anti Pn I และ anti Pn 19 (แถวที่ 3) ตัวเลขแถวล่างคือหมายเลขของกระต่ายที่ผลิตน้ำเหลือง

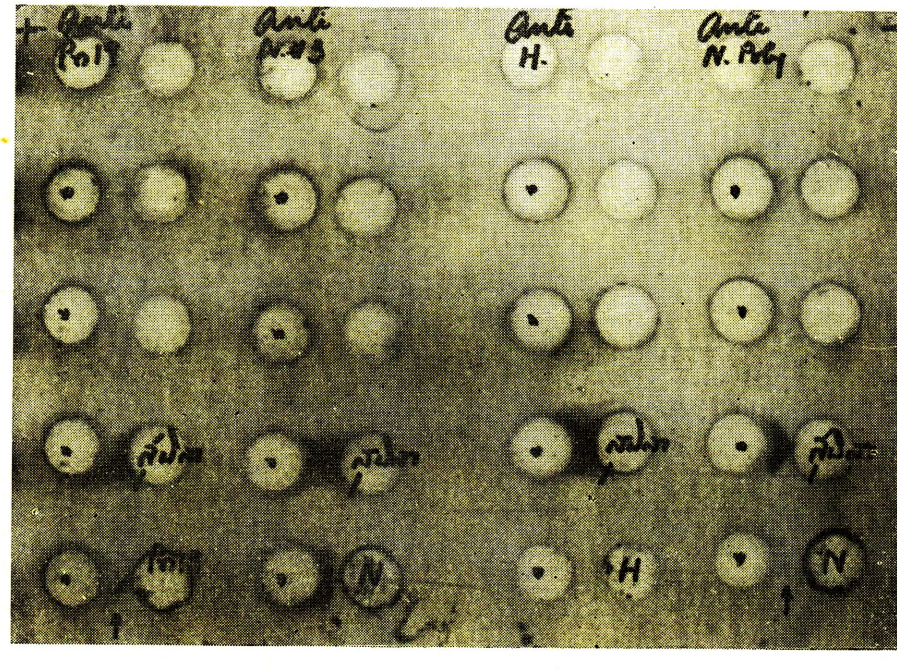


ภาพที่ 3 Antipneumococcal antiserum จากกระต่ายตัวที่ 4 สามารถตรวจเชื้อ Pneumococcus จากน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยรายที่ 3 ได้ (แถวล่างสุด) แถวที่ 1 และที่ 3 ตามแนวตั้งคือ anti Pn 19 จากกระต่ายตัวที่ 4 ที่ไม่เจือจางและเจือจาง 1 : 4 ตามลำดับ แถวที่ 5 และ 7 ก็เช่นกันแต่เป็น anti Pn 19 จากกระต่ายตัวที่ 5 แถวที่ 1,2 และ 3 ตามแนวนอนคือ Pn 19 ที่ไม่เจือจาง 1 : 4 และ 1 : 16 ตามลำดับ หลุมที่เหลือคือหลุมที่ใส่น้ำไขสันหลังของผู้ป่วย 7 ราย (ใช้ 200 Volt เวลา 90 นาที)





ภาพที่ 4 Antineisseria group A จากกระต่ายตัวที่ 3 ให้ผลบวกกับ Neisseria group A antigen (แถวที่ 5 หลุมที่ 3 และ 4) ส่วน Antineisseria Poly (Difco) ทำปฏิกริยากับน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยรายที่ 7 ได้ดีกว่า Neisseria group A antigen (ศรชี้แถวล่างสุด) ผลที่ได้ทำที่ 250 Volt เวลา 90 นาที



monospecific antiserum (สถาบัน Statenserum ประเทศเดนมาร์ก) และจากการเพาะเชื้อขึ้นในห้องปฏิบัติการของแผนก

เชื้อ N. meningitidis group A (NC 10025), group B (NC 10026) และ group C (NC 8554) ขอจากสถาบัน Statenserum ประเทศเดนมาร์ก นำมาเพาะให้มีปริมาณเพิ่มขึ้นใน Enriched chocolate agar, Thayer-Martin Medium (BBL product) แล้วเก็บไว้ในรูปผงแห้ง (lyophilized)

เชื้อ H. influenza type B สั่งซื้อจาก Hyland นำมาเลี้ยงใน Enriched chocolate agar ที่มี Isovitale X เป็นอาหารเสริม

Pneumococcal antigen ปั่นเชื้อขึ้นในอาหารเหลว BHIS (Brain heart infusion broth with 5% horse serum, BBL) 4 ชั่วโมงแล้วล้างด้วยน้ำเกลือ 3 ครั้ง ใส่ formalin ลงไป 5% โดยปริมาตร เก็บไว้ในตู้เย็นค้างคืน ปั่นล้างอีก 3 ครั้ง อุ่นหลอดที่ 60°C 30 นาที เพื่อฆ่าเชื้อล้างด้วยน้ำเกลืออีก 3 ครั้ง จึงใส่น้ำเกลือลงไปให้ได้ความขุ่นตามต้องการ

Meningococcal antigen group A ละลายเชื้อ N. meningitidis จาก chocolate agar ด้วย Hank balanced salt solution ในปริมาณ 1×10^9 เซลล์/มล. เก็บไว้ในหลอดเล็กๆตามปริมาณที่จะฉีดแต่ละวันแช่ไว้ที่ −30°C จนกว่าจะใช้

Polystyrene Latex ขนาด 0.81 จาก Difco

สัตว์ทดลอง คือกระต่ายปกติสีขาว ตาแดง น้ำหนักขณะเริ่มทำการทดลองประมาณ 2.5 กิโลกรัม ไม่จำกัดเพศ ได้จากศูนย์สัตว์ทดลอง โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

Counterimmunoelectrophoresis (CIE)

ดูดวุ้น (1.0% agarose in Veronal buffer, pH 8.2) 10 มล. และ 13 มล. ลงบนกระจกบางที่มีขนาด 8 × 10 ซม. และ 10 × 10 ซม. ตามลำดับ เมื่อวุ้นแข็งตัว เจาะรูขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มม. ห่างกัน 4 มม. (ริมต่อริม) จำนวนหลุมแล้วแต่ต้องการ ดูดเอาวุ้นในหลุมออก แล้วใส่แอนติบอดีลงทางแถวซ้าย (ขั้วบวก) แอนติเจนหรือน้ำไขหลังลงทางขวา (ขั้วลบ) มีกลุ่มควบคุมบวกลบในแต่ละแผ่น วางกระจกบนถาดแล้วนำถาดไปวางบนสันของเครื่อง electrophoretic chamber ซึ่งมี Veronal buffer ปริ่มอยู่พื้นล่าง ใช้กระดาษกรองที่ชื้นเป็นสะพานให้กระแสไฟฟ้าผ่านวุ้น 200 Volt 90 นาที (เปลี่ยน voltage และเวลาในบางการทดลอง) เมื่อครบกำหนดเวลาปิดเครื่อง ตรวจดูเส้นตะกอนสีขาวที่เกิดระหว่างหลุมของแอนติบอดีและแอนติเจน ถ้ามีแสดงว่าให้ผลบวก เก็บกระจกไว้ในตู้ชื้นค้างคืน เพื่อบันทึกผลอีกครั้ง

Latex sensitization

นำแอนติซีรั่มแต่ละชนิดมาตกตะกอนด้วย half saturated ammonium sulphate และ dialysis ข้ามคืนใน glycine buffer saline (GBS) จะได้ส่วนของ γ-globulin ทดสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี immunoelectrophoresis แล้วนำ

γ-globulin มาเจือจางที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อหา titer (จาก slide agglutination) ผสม 1 ส่วนของ γ-globulin ที่ความเข้มข้นเหมาะสมกับ 1 ส่วนโดยปริมาตรของ Latex (0.81 μ, Difco) แกว่งให้ผสมกันแล้วอุ่นที่ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เติม 2 ส่วนของ GBS ที่มี 0.1% Bovine serum albumin (Sigma) ลงไปอุ่นที่ 37°C, 30 นาที อีกครั้งจะได้ sensitized latex ที่พร้อมจะใช้งาน เก็บได้นานเป็นเดือนในตู้เย็น

Latex agglutination

หยด 0.04 มล. ของน้ำไขสันหลังรวมกับ 0.02 มล. ของ sensitized latex ใน slide หลุม (Clays Adam) แล้วแกว่งในแนวราบ 5–8 นาที การอ่านผล อ่านตามวิธีของ New man[8] ถ้าเกิดตะกอนมากกว่า 2 หลุม ควรคิดว่าเป็น false positive จะต้องกำจัดโดยการแช่น้ำร้อน 100°C, 15 นาทีหรือทำให้เจือจางเพิ่มขึ้น แล้วจึงนำมาทดสอบใหม่

Antipneumococcal antiserum

เทียบความขุ่นของเชื้อ Pneumococcus ที่ละลายในน้ำเกลือให้เท่ากับ McFarland หลอดที่ 2 (ประมาณ 6×10^8 เซลล์/มล.) ฉีดเข้าเส้นเลือดดำที่หูของกระต่าย 5 ตัวด้วย Pneumococcus ปริมาณต่าง ๆ กัน เริ่มจาก 0.5 มล. ค่อย ๆ เพิ่มปริมาณไปจนถึง 3.0 มล. ในสัปดาห์ที่ 4 กระต่ายตัวที่ 1 และ 2 ฉีด Pneumococcal antigen type I (Pn I) ตัวที่ 3 ด้วย Pn 9 ตัวที่ 4,5 ด้วย Pn 19 ฉีด 3 วันติดต่อกันในแต่ละสัปดาห์ รวม 4 สัปดาห์ สัปดาห์ที่ 5 เจาะเลือดมาหา titer ทิ้งไว้จนสัปดาห์ที่ 8 จึงฉีดซ้ำแต่ฉีดทางใต้ผิวหนัง

Antimenigococcal group A antiserum

เจาะเลือดกระต่ายทั้งหมดก่อนการฉีดแอนติเจน 2–3 วันไว้เพื่อเปรียบเทียบภายหลัง แบ่งกระต่ายเป็น 2 กลุ่ม ๆ ละ 2 ตัว กลุ่มแรกฉีดเชื้อเข้าทางหลอดเลือดดำ วิธีการเหมือนการเตรียม antipneumococcal antiserum กลุ่มที่ 2 ฉีดติดต่อกัน 16 วัน 6 วันแรกทางใต้ผิวหนัง 5 วันต่อมาทางช่องท้อง 5 วันหลังทางหลอดเลือดดำ วันที่ 18 ถึง 41 ฉีดวันเว้นวันทางหลอดเลือดดำ ปริมาตรที่ฉีดเริ่มจาก 0.1 ไป 0.5 มล. ในแต่ละช่วง วันที่ 18 เริ่มจาก 1 มล.ไปจนถึง 3 มล. ในวันที่ 41 วันที่ 48 เจาะเลือดมาหาปริมาณแอนติบอดี ด้วยการเกาะกลุ่มตะกอนบนสไลด์ (slide agglutination)

ผล

จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าองค์ประกอบในการตรวจหาเชื้อแต่ละชนิดต่างกันเล็กน้อยสำหรับ H. influenza ใช้แรงคลื่นไฟฟ้า 150–200 Volt เวลา 60 ถึง 90 นาที S. pneumoniae ใช้ 200 Volt เวลา 90 นาที ส่วน N. meningitidis ใช้ 200 Volt เวลา 90 นาที หรือ 250 Volt เวลา 60 นาทีก็ได้ ในระยะแรก ๆ ของการศึกษายังตรวจพบน้ำไขสันหลังที่ให้ผลบวกน้อย อาจเป็นเพราะแอนติซีรั่มที่ใช้ยังไม่เหมาะสม เช่น

ตารางที่ 2 ปริมาณ Antipneumococcal antiserum ที่เตรียมเอง

ความเข้มข้นสุดท้ายของแอนติเจน ที่ให้ผลบวก	แอนติบอดีต่อ	กระต่ายตัวที่	ปริมาณ (tietr ที่ได้)	
			ฉีดชุดแรก	ฉีดซ้ำ
1 : 64	Pn I	1, 2	1 : 32	—
1 : 32	Pn 9	3	1 : 8	1 : 8
1 : 32	Pn 19	4	1 : 16	1 : 16
1 : 32	Pn 19*	5*	1 : 8	1 : 32

* ฉีดเชื้อปริมาณมากกว่าตัวอื่นคือ McFarland หลอด 3 (ประมาณ 9×10^8 เซลล์/มล.)

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบวิธีการเตรียม Antimeningococcal group A antiserum ในกระต่าย 2 กลุ่ม

	วิธีที่ 1	วิธีที่ 2
จำนวนครั้งที่ฉีด	15	28
ระยะเวลาที่ใช้	41 วัน	48 วัน
วิธีที่ฉีด	หลอดเลือดดำ	ใต้ผิวหนัง ช่องท้อง หลอดเลือดดำ
ปริมาณแอนติเจนที่ใช้ต่อกระต่าย 1 ตัว	22.5 มล.	37.5 มล.
Titer ของแอนติซีรั่ม	1 : 16, 1 : 32	1 : 32 , 1 : 32

ตารางที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อและวิธี CIE ในผู้ป่วย 115 ราย*

ผู้ป่วยลำดับที่	ผลการเพาะเชื้อ	เชื้อที่เพาะขึ้น (หรือย้อมได้)	CIE	แอนติเจนตรวจพบ	แอนติบอดีที่ทำปฏิกริยา
1.	+	S. pneumoniae	—		
2.	+	S. pneumoniae	—		
3.[a]	+	S. pneumoniae	+	S. pneumoniae	Anti Pn 9
4.	+	S. pneumoniae	+	S. pneumoniae	Anti Pn I
5.	+	S. pneumoniae	+	S. pneumoniae	Anti Pn I
6.	+	Meningococci	+	N. meningitidis	Anti N
7.[b]	+	Meningococci	+	N. meningitidis	
8.	+	Meningacocci	—		
9.	+	H. influenza	—		
10.	+	Klebsiella	—		
11.	+	Klebsiella	—		
12.	+	Staph. albus	—		
13.	+	Staph., albus	+	S. pneumoniae	Anti Pn 19
14.	+	(Gm-ve cocci)	+	S. pneumoniae	Anti Pn I
15.[c]	+	Salmonella E	—		
16.	+	Enterobacter	—		
17.	—		+	N. meningitidis	Anti N
18.	—		+	S. pneumoniae	Anti Pn 19
19.	—		+	H. influenza	Anti H
20.	—		+	S. pneumoniae	Anti Pn 9
21.	+		+	S. pneumoniae	Anti Pn 19

* ผู้ป่วยลำดับที่ 22–115 ให้ผลลบทั้งสองวิธี a = ดูภาพที่ 3, b = ดูภาพที่ 4, c = ภาพที่ 2

ตารางที่ 5 สรุปความสัมพันธ์ระหว่างผลการเพาะเชื้อและ CIE

CIE	ผลการเพาะเชื้อ		รวม (ราย)
	ผลบวก (ราย)	ผลลบ (ราย)	
ผลบวก	7	5	12
ผลลบ	9	94	103
รวม	16	99	115

ไม่ได้ใช้ Pneumococcal Omniserum จากประเทศเดนมาร์ก ซึ่งให้ผลดีในรายงานทุกฉบับ แต่ใช้ที่ซื้อจากบริษัท Difco ซึ่งมี titer ต่ำแทน เพราะถูกกว่ามาก เพื่อแก้ไขอุปสรรคดังกล่าว จึงได้เตรียมแอนติซีรั่ม ต่อ Pneumococcus type 1,9 และ 19 ขึ้นเอง ผลที่ได้ (ตารางที่ 2) แสดงว่า titer ของแอนติซีรั่มทุกตัวเกินกว่า 1 : 8 เมื่อฉีดซ้ำ titer ยังคงเดิม เว้นตัวที่ 5 ซึ่งเพิ่มขึ้น 4 เท่า อธิบายได้ว่าแอนติบอดีต่อเชื้อ pneumococcus เป็นชนิด IgM ซึ่งปริมาณมักจะคงที่ไม่ว่าจะฉีดกี่ครั้ง การที่กระต่ายตัวที่ 5 มี titer เพิ่มขึ้นอาจเพราะใช้แอนติเจนปริมาณที่เหมาะสมหรือเป็นเพราะความสามารถของตัวกระต่ายเอง

สำหรับ antimenigococcal antiserum ของบริษัท Difco ใช้ได้ดีสำหรับงาน CIE เพราะเป็นชนิดที่นิยมใช้ แต่ถ้าจะนำมาตกตะกอนเพื่อแยกส่วน γ-globulin มาใช้สำหรับงาน LA ก็จะแพงมาก จึงทดลองเตรียมในกระต่าย 4 ตัวด้วย 2 วิธีการ (ตารางที่ 3) titer ที่ได้พอ ๆ กัน คือ 1 : 32 แต่วิธีการที่ 2 ยุ่งยากกว่า

จากการทดสอบปฏิกริยาเฉพาะ (specificity) ของน้ำเหลืองต่าง ๆ พบว่า antipneumococcus type I (Anti Pn I), Anti Pn9, Anti Pn 19 และ antineisseria group A antiserum ทำปฏิกริยาเฉพาะกับแอนติเจนของมัน (ภาพที่ 1,3, 4) และไม่ทำกับ antigen จาก Klebsiella, Salmonella หรือ E. Coli อย่างไรก็ตาม Pn 9 antigen ที่ความเข้มข้น 1 : 16 สามารถทำปฏิกริยาข้ามกลุ่ม (cross reaction) กับ Anti Pn I และ Anti Pn 19 ที่ไม่เจือจาง (ภาพที่ 2)

ในการศึกษา LA เมื่อใช้ γ-globulin ที่เจือจาง 1 : 40 สามารถตรวจหาแอนติเจนปริมาณน้อย ๆ ได้ คือประมาณ 12–25 ไมโครกรัม/มล.

ตารางที่ 6 ผลของ LA ในผู้ป่วย 207 ราย

ชนิดของ sensitized latex	ผลที่ได้			ผลบวกคลาดเคลื่อน	รวม (ราย)
	ผลบวก (ราย)	ผลลบ (ราย)	ก้ำกึ่ง (ราย)		
antipneumococcus	19	76	3	2*	100
anti H. inffuenzae	3	50	–	1+	54
antineisseria	1	49	3		53
รวม	23	175	6	3	207

*ผลการเพาะเชื้อขึ้น Klebsiella และ Salmonella

+ผลการเพาะเชื้อขึ้น S. pneumoniae

ความเข้มข้นของแอนติเจนตั้งแต่ 50 ไมโครกรัม/มล. ขึ้นไปจะให้ผล false positive กับ γ-globulin ของกระต่ายปกติ จากการทดสอบกับตัวอย่างน้ำไขสันหลัง 207 ราย พบให้ผลบวก 23 ราย หรือร้อยละ 11.1 และลบร้อยละ 84.5 (ตารางที่ 6) ผลคลาดเคลื่อนผิดชนิดไป 3 ราย คือให้ผลบวกกับน้ำไขสันหลังที่มีเชื้ออื่นที่ไม่ตรงกับแอนติซีรั่มที่ใช้ (การศึกษาเปรียบเทียบผลของ LA กับการเพาะเชื้อจะทำในงานวิจัยอันต่อไป)

วิจารณ์

แอนติซีรั่มต่อเชื้อทุกชนิดที่เตรียมเองมีปริมาณแอนติบอดีพอสมควรคือประมาณ 1 : 8 ถึง 1 : 32 และใช้ได้ผลในปฏิกริยาทั้ง CIE และ LA ปฏิกริยาข้ามกลุ่มยังมีอยู่บ้างใน anti PnI และ anti Pn19 เพราะผู้วิจัยไม่ได้ดูดซับ (absorption) ด้วยแอนติเจนที่มันทำปฏิกริยาข้ามกลุ่มออกไป เพราะเกรงว่าจะทำให้ปริมาณแอนติบอดีลดต่ำลงด้วยการทำดังกล่าว

หลังจากได้ศึกษาตัวแปรในปฏิกริยา CIE แล้วพบว่าองค์ประกอบที่เหมาะสมของปฏิกริยาคือที่แรงคลื่นไฟฟ้า 200 Volt เวลา 90 นาที ซึ่งตรงกับวิธีของ Coonrod[1,2] หรือ 250 Volt เวลา 60 นาที องค์ประกอบที่เหลือคืออัตราส่วนที่พอเหมาะของปริมาณแอนติบอดี และ แอนติเจนที่จะแสดงผลให้เห็น เมื่อใช้แอนติเจนที่เป็นจุลชีพที่อ่อนฤทธิ์เป็นกลุ่มควบคุมบวกมักได้ผลดี เส้นตะกอนเห็นได้ชัด แต่เมื่อทำกับน้ำไขสันหลังของผู้ป่วยมักเห็นจาง แสดงว่าปริมาณแอนติเจนในน้ำไขสันหลังมีน้อยเกินกว่าจะทำปฏิกริยากับแอนติบอดีและเกิดตะกอนให้เห็นได้ อีกนัยหนึ่งก็คือแอนติบอดีมีประสิทธิภาพไม่สูงพอหรือมีปริมาณไม่มากพอ เพราะสังเกตว่าเส้นตะกอนมักจะอยู่ชิดไปทางหลุมของแอนติบอดีเป็นส่วนมากในรายที่น้ำไขสันหลังให้ผลบวก ในรายที่เชื้อเพาะขึ้นแต่ CIE ให้ผลลบ(เลขที่ 1,2,8,9 ในตารางที่ 4) ก็เป็นเครื่องชี้ว่าวิธีการ CIE ที่คณะผู้วิจัยทำนี้ยังมีความไวไม่มาก ใน 5 รายที่ CIE ให้ผลบวกและเชื้อเพาะไม่ขึ้น อาจเป็นได้ว่าเชื้อได้ตายไปแล้ว ผลบวกและลบที่ตรงกัน 7 และ 94 ราย ตามลำดับ ชี้ให้เห็นว่า CIE ให้ผลคล้องจองกับผลการเพาะเชื้อ นอกจากนี้ CIE ยังทำปฏิกริยาเฉพาะค่อนข้างสูง ผลที่ได้จึงแน่นอน

ปฏิกริยา LA มีความไวสูง แอนติเจนปริมาณเพียง 12 ไมโครกรัม/มล. ก็สามารถให้ผลบวก ในขณะที่ความเข้มข้นนี้จะให้ผลลบกับ CIE ในกรณีที่แอนติเจนหรือเชื้อในน้ำไขสันหลังมีปริมาณมาก โอกาสที่จะเกิดผลคลาดเคลื่อนบวกก็มีมาก การศึกษา LA นี้เป็นเพียงการศึกษาเริ่มต้น เพื่อเรียนรู้ตัวแปรและองค์ประกอบที่จะทำให้ผลคลาดเคลื่อน ผลที่ได้สรุปอะไรไม่ได้มาก เพราะไม่มีผลการเพาะเชื้อมาสนับสนุน การศึกษาเปรียบเทียบวิธีการดังกล่าว จะทำในโครงการวิจัยซึ่งได้รับการสนับสนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดินปี พ.ศ. 2521

งานวิจัยชิ้นนี้ไม่สามารถจะเปรียบเทียบได้กับผลการวิจัยในรายงานต่างประเทศ (ตารางที่ 1) เนื่องจากไม่ได้ใช้ Pneumococcal Omniserum

หรือ polyvalent group A-I และ anti H. influenza ของบริษัท Hyland แต่ใช้ของ Difco แทน สาเหตุประการแรกเพราะราคาแพงมาก จะต้องสั่งซื้อโดยตรง ประการต่อมาคือไม่มีจำหน่าย (anti H. influenza) ในช่วงของการวิจัยนี้ นอกจากนั้นการเพาะเชื้อที่มักให้ผลลบอยู่บ่อยมาก (98 จาก 115 ตัวอย่าง ตารางที่ 4) ก็เป็นเหตุให้กลุ่มควบคุมบวกมีปริมาณน้อยมาก คณะผู้วิจัยมีความหวังว่าจะแก้อุปสรรค และปรับปรุงวิธีการทั้งหมดให้ดีขึ้นในงานวิจัยขั้นต่อไป

สรุปผลการทดลอง

1. titer ของ antipneumococcal antiserum ที่เตรียมเองไม่ต่ำกว่า 1 : 8 ส่วนของ anti-meningococcal group A antiserum ไม่ต่ำกว่า 1 : 16 นำมาใช้ทดสอบกับน้ำไขสันหลังของคนไข้ในปฏิกริยา CIE หรือตกตะกอนเอาส่วน γ-globulin ไปใช้ในการเตรียม sensitized latex

2. ปฏิกริยา CIE ให้ผลเป็นที่พอใจ เมื่อใช้แรงคลื่นไฟฟ้า 200 Volt เวลา 90 นาที ในการตรวจหาเชื้อทั้ง 3 ชนิด ผลที่ได้น่าเชื่อถือเพราะแอนติซีรั่มที่ใช้ในการทดสอบทำปฏิกริยาเฉพาะกับแอนติเจนของมัน และผลส่วนใหญ่ยังคล้อยตามกับผลของการเพาะเชื้อ คือมีเชื้อขึ้น 16 ราย CIE ให้ผลบวก 12 ราย ในผู้ป่วย 115 ราย ในบางรายเชื้อเพาะไม่ขึ้นแต่สามารถตรวจพบได้โดยวิธี CIE

3. ปฏิกริยา LA ให้ผลลบ 175 ราย ใน 207 ราย (ร้อยละ 84.5) และให้ผลบวก 23 ราย (ร้อยละ 11.1) จากผู้ป่วยจำนวนเดียวกัน ผลคลาดเคลื่อนมีบ้างเล็กน้อย

โดยสรุป ปฏิกริยา CIE ให้ผลน่าเชื่อถือกว่า LA แต่มีความไวของปฏิกริยาน้อยกว่า การทดสอบทั้งสองใช้ได้ด้วยจุดประสงค์ต่างกัน LA สำหรับการทดสอบคร่าว ๆ (screening) CIE สำหรับงานที่ยืนยันผลการเพาะเชื้อหรือช่วยวินิจฉัยในกรณีที่เชื้อเพาะไม่ขึ้น

กิติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณรองศาสตราจารย์แพทย์หญิงอัมพร สุคนธมาน ที่ให้ความอนุเคราะห์ขอเชื้อ N. meningitidis group A, B, C จากสถาบัน Statenserum ประเทศเดนมาร์ก อาจารย์นิพนธ์ อุดมสันติสุข และนักศึกษาแพทย์วรชัย ตั้งวรพงษ์กิจ ที่ช่วยฉีดกระต่าย อาจารย์สุรนันท์ ทัศนียพันธ์ ในการเตรียมต้นฉบับ

เอกสารอ้างอิง

1. Coonrod JD, Rytel, MW : Determination of aetiology of bacterial meningitis by counterimmunoelectrophoresis. Lancet 1 : 1154-57, 72
2. Coonrod, JD, and Rytel, MW : Detection of type specific pneumococcal antigen by counterimmunoelectrophoresis. Methodology and immunologic properties of pneumococcal antigens. J Lab Clin Med 81 : 771, 73
3. Edwards, EA,: Immunologic Investigations of Meningococcal Disease, J Immunol 106 : 314-17, 71
4. Feigin, RD, Wong, M, Shackelford, PG, Stechenberg, BW, Dunkle, LM, and Kaplan, S: Countercurrent immunoelectrophoresis of urine as well as of CSF and blood for diagnosis of bacterial meningitis J Pedia 89 (Nov), 773-75, 76
5. Greenwood, BM, Whittle, HC, Doninic-Rajkovic, O : Countercurrent immunoelectrophoresis in the

diagnostic of meningococcal infections Lancet, September 4, 517, 71

6. Kaldor, J, Asznowicz, R, and Buist, DGP : Latex agglutination in diagnosis of bacterial infections, with special reference to patients with meningitis and septicemia Am J Clin pathol 68 : 284-89, 77
7. Michaels, RH, and Poziviak, CS : Countercurrent immunoelectrophoresis for the diagnosis of pneumococcal pneumonia in children J Pedia 88 (Jan.), 72-74, 76
8. Newman RB, Stevens, RW, Gaafar HA : Latex agglutination test for the diagnosis of Haemophilus influenzae meningitis J Lab Clin Med 76 : 107-13, 70
9. Severin, WPJ : Latex agglutination in the diagnosis of meningococcal infections J Clin Path 25 : 583-85, 72
10. Severin, WPJ : Latex agglutination in the diagnosis of meningococcal meningitis J Clin Path 25 : 1079-82, 72
11. Shackelford, PG, Campbell, J, and Feigin, RD : Countercurrent immunoelectrophoresis in the evaluation of childhood infections J Pedia 85, 478-81, 74
12. Whittle, HC, Tugwell-P, Egler, LJ, and Greenwood, BM : Rapid Bacteriological Diagnosis of pyogenic meningitis by Latex Agglutination Lancet, September 14, 619, 74

LIBR CHU

Rapid diagnostic methods for H. influenza, Pneumococcal and Meningococcal meningitis*

Mai Ratanavararaksa M. Sc. **
Pongpan Nanthapisutha M. Sc. **
Dilok Yenbutra M.D. **

Two rapid diagnostic methods for detection of H. influenza S. pneumoniae and N. meningitidis in the cerebrospinal fluid of patients with clinically diagnosed meningitis were compared. The two methods were counterimmunoelectrophoresis (CIE) and latex agglutination (LA) which took 90 minuites and 8 minuites respectively for each test. From 115 specimens tested by CIE, eight were positive and ninety-four were negative, the result corresponded very well with those of the culture. The other fourteen did not correspond. LA. tests gave 23 positive, 175 negative and 9 false positive out of 207 specimens. The result of CIE was specific. Its sensitivity was dependent upon the potency of the immune serum. The sensitivity of LA was higher but the specificity was lower than those of CIE.

*Supported by the China Medical Board Research Grant 1977.
**Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University